

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号
特開2002-95469
(P2002-95469A)

(43)公開日 平成14年4月2日(2002.4.2)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード*(参考)
C 1 2 N 9/24		C 1 2 N 9/24	4 B 0 5 0
1/16		1/16	B 4 B 0 6 5
// (C 1 2 N 9/24		(C 1 2 N 9/24	
C 1 2 R 1:645)		C 1 2 R 1:645)	

審査請求 未請求 請求項の数7 O L (全 8 頁)

(21)出願番号 特願2000-291037(P2000-291037)

(22)出願日 平成12年9月25日(2000.9.25)

(71)出願人 396020800
科学技術振興事業団
埼玉県川口市本町4丁目1番8号
(71)出願人 500446410
河東田 茂義
山形県鶴岡市稲生二丁目27-8-203
(71)出願人 392022097
日東ベスト株式会社
山形県寒河江市幸町4番27号
(72)発明者 河東田 茂義
山形県鶴岡市稲生二丁目27-8-203
(74)代理人 100093230
弁理士 西澤 利夫

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 エンド-β-1,3-マンナナーゼとその製造方法

(57)【要約】

【課題】 製造・精製が容易で、しかも高い安定性を有するエンド-β-1,3-マンナナーゼと、この酵素の製造方法を提供する。

【解決手段】 以下の理化学的性質、ロドトルラ (Rhodotorula) 属に属する酵母が菌体外に生産するβ-1,3-;β-1,4-マンナンのβ-1,3-D-マンノピラシド結合を特異的に加水分解し、最終的にβ-1,4-マンノビオースを生成する;β-1,3-;β-1,4-マンナンに特異的に作用し、α-マンナン、コンニャクマンナン、グルコマンナン、ガラクトマンナンおよびガラクトグルコマンナンに作用せず、β-マンノシダーゼ活性を持たない;至適pHは5.0であり、30℃、30分の条件下ではpH4.0~10.0の範囲で安定である;分子量が52,000±1,000であるなどを有するエンド-β-1,3-マンナナーゼと、ロドトルラ属酵母を用いてこのエンド-β-1,3-マンナナーゼを製造する方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記理化学的性質：

(イ) 作用：ロドトルラ (*Rhodotorula*) 属に属する酵母が菌体外に生産する β -1,3-; β -1,4-マンナンの β -1,3-D-マンノピラシド結合を特異的に加水分解し、最終的に β -1,4-マンノビオースを生成する；

(ロ) 基質特異性： β -1,3-; β -1,4-マンナンに特異的に作用し、 α -マンナン、コンニャクマンナン、グルコマンナン、ガラクトマンナンおよびガラクトグルコマンナンに作用せず、 β -マンノシダーゼ活性を持たない；

(ハ) 至適pHおよび安定pH範囲：至適pHは5.0であり、30℃、30分の条件下ではpH4.0～10.0の範囲で安定である；

(ニ) 温度に対する安定性：pH5.0、30分の加熱条件下では40℃まで安定である；

(ホ) 作用温度の範囲：50℃に至適作用温度を有する；

(ヘ) 失活条件：60℃、30分の加熱条件下でpH5.0で完全に失活する；

(ト) 阻害および活性化：1 mMの塩化第二銅、塩化第二水銀により完全に阻害を受ける；

(チ) SDS-ポリアクリルアミドおよび未変成ポリアクリルアミド電気泳動法による分子量：いずれも52,000 \pm 1,000；を有するエンド- β -1,3-マンナナーゼ。

【請求項2】 下記理化学的性質：

(イ) 作用：ロドトルラ (*Rhodotorula*) 属に属する酵母が菌体外に生産する β -1,3-; β -1,4-マンナンの β -1,3-D-マンノピラシド結合を特異的に加水分解し、最終的に β -1,4-マンノビオースを生成する；

(ロ) 基質特異性： β -1,3-; β -1,4-マンナンに特異的に作用し、 α -マンナン、コンニャクマンナン、グルコマンナン、ガラクトマンナンおよびガラクトグルコマンナンに作用せず、 β -マンノシダーゼ活性を持たない；

(ハ) 至適pHおよび安定pH範囲：至適pHは5.0であり、30℃、30分の条件下ではpH4.0～10.0の範囲で安定である；

(ニ) 温度に対する安定性：pH5.0、30分の加熱条件下では40℃まで安定である；

(ホ) 作用温度の範囲：50℃に至適作用温度を有する；

(ヘ) 失活条件：60℃、30分の加熱条件下でpH5.0で完全に失活する；

(ト) 阻害および活性化：1 mMの塩化第二銅、塩化第二水銀により完全に阻害を受ける；

(チ) SDS-ポリアクリルアミドおよび未変成ポリアクリルアミド電気泳動法による分子量：いずれも52,000 \pm 1,000；を有するエンド- β -1,3-マンナナーゼ生産能を有し、かつ生育の至適pHを酸性に有するロドトルラ属に属する酵母を培養して培養液中にエンド- β -1,3-マンナナーゼを生成・蓄積させ、それを単離・精製することを特徴とする菌体外エンド- β -1,3-マンナナーゼの製造方法。

【請求項3】 ロドトルラ属に属する酵母の培養を20～30℃で好氣的に行う請求項2の方法。

【請求項4】 ロドトルラ属に属する酵母を培養する培養液のpHを4.0～6.0とする請求項2または3の方法。

【請求項5】 ロドトルラ属に属する酵母を培養後、培養上澄液を分離し、さらに精製して精製マンナナーゼを得る請求項2から4のいずれかの方法。

【請求項6】 ロドトルラ属に属する酵母が、*Rhodotorula mucilaginosa* YR-2株 (FERM P-18024) である請求項2から5のいずれかの方法。

【請求項7】 *Rhodotorula mucilaginosa* YR-2株 (FERM P-18024)。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】この出願の発明は、新規なエンド- β -1,3-マンナナーゼと、その製造方法に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、 β -1,3-; β -1,4-マンナンを加水分解して分解生成物を有効利用したり、 β -1,3-; β -1,4-マンナン自体を糊料等として使用した後に分解・除去するために有用なエンド- β -1,3-マンナナーゼと、その製造方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】エンド- β -1,3-マンナナーゼは、分子内に β -1,3-D-マンノピラシド結合を持つロドトルラ (*Rhodotorula*) 属が生産する β -1,3-; β -1,4-マンナンを特異的に加水分解し、最終的に β -1,4-マンノビオースを生成する酵素である。

【0003】 β -1,3-マンノシド結合を含むマンナンはロドトルラ属が生産する β -1,3-; β -1,4-マンナンしか知られていない。これまで、このマンナンが血清コリンエステラーゼの活性化および安定化作用を有し、いくつかの動物腫瘍の発達を阻害することが知られている。

【0004】このマンナンの β -1,3-マンノシド結合を加水分解する酵素として知られている β -マンナナーゼは糸状菌 (*Agric. Biol. Chem.*, 42:1651, 1978) のみである。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、糸状菌酵素の β -1,3-; β -1,4-マンナンに対する作用機作は明らかでなく、工業的に利用する点で不十分であった。 β -1,3-; β -1,4-マンナンの加水分解によるマンノオリゴ糖を効率よく回収・利用するためには作用機作が明らかで、安定性に優れ、酵素の精製が容易であることが望ましい。従って、製造・精製が容易で、しかも高い安定性を有するエンド- β -1,3-マンナナーゼを新たに開発することは β -1,3-; β -1,4-マンナンを分解し、その分解生成物を利用する上できわめて大きな意義をもつ。

【0006】この出願の発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであって、前記の各種要件を満たす新規なエンド- β -1,3-マンナナーゼと、この酵素を高い

生産効率で生成する方法とを提供することを課題としている。

【0007】

【課題を解決するための手段】この出願の発明者らは、工業的に使用可能なエンド-β-1,3-マンナナーゼが具備すべき前記諸性質を有する酵素を生産する能力を持つ微生物を得るべく、広く自然界を検索した結果、β-1,3-;β-1,4-マンナンを生成するロドトルラ属に属するある種の酵母が上記要件を備えた酵素を産生し、またこれを量産性良く産生することを見出して発明を完成した。

【0008】この出願は、前記の課題を解決する第1の発明として、下記理化学的性質：

(イ) 作用：ロドトルラ (*Rhodotorula*) 属に属する酵母が菌体外に生産するβ-1,3-;β-1,4-マンナンのβ-1,3-D-マンノピラシド結合を特異的に加水分解し、最終的にβ-1,4-マンノビオースを生成する；

(ロ) 基質特異性：β-1,3-;β-1,4-マンナンに特異的に作用し、α-マンナン、コンニャクマンナン、グルコマンナン、ガラクトマンナンおよびガラクトグルコマンナンに作用せず、β-マンノシダーゼ活性を持たない；

(ハ) 至適pHおよび安定pH範囲：至適pHは5.0であり、30℃、30分の条件下ではpH4.0~10.0の範囲で安定である；

(ニ) 温度に対する安定性：pH5.0、30分の加熱条件下では40℃まで安定である；

(ホ) 作用温度の範囲：50℃に至適作用温度を有する；

(ヘ) 失活条件：60℃、30分の加熱条件下でpH5.0で完全に失活する；

(ト) 阻害および活性化：1 mMの塩化第二銅、塩化第二水銀により完全に阻害を受ける；

(チ) SDS-ポリアクリルアミドおよび未変成ポリアクリルアミド電気泳動法による分子量：いずれも52,000±1,000；を有するエンド-β-1,3-マンナナーゼを提供する。

【0009】またこの出願は、第2の発明として、前記第1発明のエンド-β-1,3-マンナナーゼ生産能を有し、かつ生育の至適pHを酸性に有するロドトルラ属に属する酵母を培養して培養液中にエンド-β-1,3-マンナナーゼを生成・蓄積させ、それを単離・精製することの特徴とする菌体外エンド-β-1,3-マンナナーゼの製造方法を提供する。

【0010】この第2発明の方法においては、ロドトルラ属に属する酵母の培養を20~30℃で好気的に行うこと、ロドトルラ属に属する酵母を培養する培養液のpHを4.0~6.0とすること、ロドトルラ属に属する酵母を培養後、培養上澄液を分離し、さらに精製して精製マンナナーゼを得ることをそれぞれ好ましい態様としてもいる。

【0011】また、この第2発明では、ロドトルラ属に

属する酵母が、*Rhodotorula mucilaginosa* YR-2株 (FERM P-18024) であることを好ましい態様とするとともに、このYR-2株そのものを第3の発明として提供する。

【0012】

【発明の実施の形態】この出願の第2発明の方法においては、前記第1発明のエンド-β-1,3-マンナナーゼ生産能を有するロドトルラ属酵母を培地で培養し、エンド-β-1,3-マンナナーゼを生成蓄積させる。培地は液体培地がよい。培養に使用する炭素源は、培養酵母が生産するβ-1,3-;β-1,4-マンナンが用いられ、その培地に対する添加量は0.2%W/Vが好ましい。さらに、0.2%のグルコースの添加が有効である。炭素源の添加方法は、培養開始時に全量を一括して添加する方法がよい。窒素源は硫酸アンモニウムが用いられ、その培地に対する添加量は0.3%W/Vが好ましい。さらに、炭素源、窒素源の他に、0.2%のKH₂PO₄、0.1%のMgSO₄・7H₂O、0.2%のペプトンおよび0.3%の酵母エキスを添加することが望ましい。また、上記酵母の培養開始時のpHは、4.0~6.0、最も好ましくは5.0であるので、約2規定の塩酸溶液で調整することが望ましい。

【0013】培養は振とうまたは通気攪拌の好気的条件下でおこなうのが好ましい。培養温度は20~30℃、好ましくは約30℃である。通気攪拌での培養中のpHは4.0~6.0、好ましくは5.0に保持する。このような培養中のpHは、1規定の燐酸溶液を添加して調整することができる。培養時間は特段の制限はなく、エンド-β-1,3-マンナナーゼの生成量が最大に達するまで培養すればよい。振とう培養では約3日、通気攪拌での培養では約30時間を目安とすることができうる。以上の培養によって得られた培養液は、遠心分離により菌体を除去し、得られた上澄み液(粗酵素液)から、限外濾過法、イオン交換樹脂、ゲル濾過法等による一般的な酵素精製法により目的の酵素を分離・精製することができる。

【0014】培養するロドトルラ属酵母は、前記第1発明のエンド-β-1,3-マンナナーゼ生産能を有する酵母であればどのようなものでも使用可能であるが、特に、この出願の発明者らが自然界から新たに単離した新規酵母ロドトルラ・ムシラギノザ(*Rhodotorula mucilaginosa*) YR-2株が好ましい。このYR-2株は、エンド-β-1,3-マンナナーゼの生産能を有し、生育の至適pHを酸性側に有するロドトルラ属に属する新規の酵母であり、平成12年9月6日付で生命工学工業技術研究所に特許微生物(受託番号：FERM P-18024)として寄託されている。表1はこのYR-2株の菌学的諸性質であり、*The Yeasts, a taxonomic study*第4版に従って、*Rhodotorula mucilaginosa*に属する新たな菌株と同定した。

【0015】

【表1】

顕微鏡的所見 (YEPD 寒天培地 30℃、3日間培養)

栄養細胞の大きさ	2~5×3~8 μm
栄養細胞の形状	酵母様の単胞、卵形の形状を示す
栄養細胞の増殖法	酵母状、両極出芽、 菌糸および偽菌糸形成せず

斜面寒天 (YEPD 寒天培地 30℃、3日間培養)

生育	良好
形態	表面は平滑状、粘稠
光沢	あり
色調	赤色

子のう胞子形成

ポテトグルコース寒天培地	形成せず
コーンミール寒天培地	形成せず
YEPD 寒天培地	形成せず
V ₈ 寒天培地	形成せず

生理学的性質

酸素要求性	好氣的
生育温度	37℃
生育 pH	1.8~7.0
硝酸カリウム資化性	無し
デンプン様物質の生成	無し
酢酸生成	無し
尿素の分解	無し
ジアゾニウムブルー B 反応	無し
ビタミンの要求性	有り
グルコース濃度	50%生育 60%生育

糖の発酵能

グルコース、ガラクトース、マルトース、ショ糖を発酵しない。

糖の資化

グルコース、ガラクトース、キシロース、ショ糖、
L-アラビノース、トレハロース、ラフィノース、
マンニトール、ガラクトチトール、2-ケトーグルコン
酸を資化し、メリピオース、メレジトース、ラクトー
ス、イヌリン、でんぷんを資化しない。

【0016】この出願の前記第2発明の方法で得られる第1発明のエンド-β-1,3-マンナナーゼは以下のような理化学的特性を有している。

作用：ロドトルラ属酵母が生産するβ-1,3-;β-1,4-マンナンのβ-1,3-マンノピラシド結合を特異的に加水分解し、最終的にβ-1,4-マンノピオースを生成する。図1は、β-1,3-;β-1,4-マンナンの構造およびエンド-β-1,3-マンナナーゼの作用部位を示す。生成物がβ-1,4-マンノピオースであることの確認は、従来の化学的分析に加えNMR分析によっている。この発明の酵素により得られたマンナン分解生成物であるマノンピオースは、ゲル濾過で分画して回収した後、図2に示した手順で過ヨウ素酸酸化、還元および部分加水分解によって生じた生成物により、β-1,4-で結合であることを確認している。さらにこのマノンピオースの構造を、図3に示した*

* 1H NMRと、図4に示した13C NMRにより確認した。β-1,3-;β-1,4-マンナンとマンノピオースの1H NMRを比較した結果、4.75ppmの4位に置換された1位のプロトンのシグナルは変化しなかったが、マンナンで見られる4.87ppmの3位に置換された1位のプロトンのシグナルはマノンピオースでは還元されなかったため、α形の5.19ppmのプロトンのシグナルと、β形の4.92ppmのプロトンのシグナルに分かれた。また、これらのマンナンとマンノピオースの13C NMRを比較した結果、100.89ppmの4位に置換された1位の炭素のシグナルは変化しなかったが、マンナンで見られる97.52ppmの3位に置換された1位の炭素のシグナルはマノンピオースでは高磁場側の94.51ppmにシフトしていたことから、マノンピオースがβ-1,4-結合であることが確認された。基質特異性：β-1,3-;β-1,4-マンナンに特異的に作用

し、 α -マンナン、コンニャクマンナン、グルコマンナン、ガラクトマンナンおよびガラクトグルコマンナンに作用せず、 β -マンノシダーゼ活性を持たない。

至適pHおよび安定pH範囲：至適pHは5.0であり、40℃、30分間の加熱条件下ではpH4～10の範囲で安定である。

温度に対する安定性：pH5.0、30分間の加熱条件下では40℃まで安定である。

作用温度の範囲：50℃に至適作用温度を有する。

失活条件：60℃、30分の加熱条件下でpH5.0で完全に失活する。

阻害および活性化：1mMの塩化第二銅、塩化第二水銀により完全に阻害を受ける。SDS-ポリアクリルアミドおよび未変成ポリアクリルアミド電気泳動法による分子量：いずれの場合も分子量は52,000 \pm 1,000である。

【0017】以下、実施例を示し、この出願の発明についてさらに詳細かつ具体的に説明するが、この出願の発明は以下の例に限定されるものではない。

実施例

10

*表2に組成を示した種培地を500mlの三角フラスコに100ml分注し、121℃で15分間蒸気滅菌した。この培地に、Y R-2株の斜面培養物を1エーゼ接種して30℃で24時間培養し、種培養物とした。振とう培養によって酵素を生産する場合は、500mlの三角フラスコに、表2の主培地を100ml分注し、121℃で15分間蒸気滅菌した。十分に生育した種培養物を1ml当たり106の細胞濃度となるよう主培地に移植し、回転数300rpm、30℃の条件下で、pHは無調整で3日間培養した。一方、10リッターのジャーファーメンターによって酵素を生産する場合は、表2に示した主培地7リットル分をジャーファーメンターに仕込み、121℃で15分間蒸気滅菌した。十分に生育した種培養物を1ml当たり106の細胞濃度となるよう主培地に移植し、攪拌数550rpm、通気7.0リットル、30℃の条件下で30時間培養した。培地のpHは1規定の燐酸を添加して5.0に保持した。

【0018】

【表2】

	種培地	主培地
ロドトルラマンナン	2.0 g/リットル	2.0 g/リットル
グルコース	2.0 g/リットル	2.0 g/リットル
酵母エキス	3.0 g/リットル	3.0 g/リットル
ペプトン	3.0 g/リットル	3.0 g/リットル
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0 g/リットル	1.0 g/リットル
KH ₂ PO ₄	2.0 g/リットル	2.0 g/リットル
MgSO ₄ · 2H ₂ O	1.0 g/リットル	1.0 g/リットル
pH(1N HCl)	5.0	5.0

【0019】培養終了後、遠心分離(10,000rpm、15分)により、菌体を除去した。得られた上澄液(粗酵素液)から以下の手順でエンド- β -1,3-マンナナーゼを分離・精製した。

【0020】粗酵素液(0.28nkat/ml)を、平均分子量10,000の限外濾過膜を用いて約10分の1に濃縮した後、24時間5℃で10mM酢酸緩衝液(pH5.0)に対して透析した。生じた沈殿を遠心分離して除き、得られた上澄液を同緩衝液で平衡化したDEAE-セルロースに吸着させ、1.0MのNaClを含む同緩衝液の直線的濃度勾配法によって酵素を溶出した。溶出した活性画分を集め、平均分子量10,000の限外濾過膜を用いて約10分の1に濃縮した後、0.15 MのNaClを含む同緩衝液で平衡化したDEAE-セファデックスA-50に吸着させ、0.5 MのNaClを含む同緩衝液の段階的濃度勾配法によって酵素を溶出させた。その結果、マンナナーゼ活性を持った3つの画分が得られ、その内の最も活性の高い画分を集めた。その画分の活性回収率は12.9%であった。次いで、同緩衝液で平衡化したセファデックスG-150によるゲルクロマトグラフィーにかけ、同緩衝液で溶出した。得られた活性画分を濃縮した後、同上カラムを用いて同一条件で再度ゲルクロマトグラフィーに※

30

※かけ濃縮し、精製酵素を得た。活性回収率は7.3%であった。この精製酵素をSDS-ポリアクリルアミドおよび未変成ポリアクリルアミド電気泳動法で均一性を検討した結果、両方の方法でもいずれも分子量52,000 \pm 1,000の均一バンドが検出された。

【0021】マンナナーゼ活性の測定法および活性表示法は以下の通りである。1/15M 酢酸緩衝液(pH5.0)1mlと、0.5%ロドトルラマンナン水溶液1mlに酵素液2mlを混合し、30℃、2時間反応させた後、還元糖量を3,6-ジニトロフタル酸による糖の微量定量法(化学の領域、第17巻、891～895、1963)により100 μ g/mlのマンノースを標準として測定した。酵素活性の単位は前述の条件下で1分間にマンノースに相当する還元糖を精製するのに要する酵素量をKatとして表示する。表3は β -1,3-マンノシド結合を加水分解すると報告されている β -マンナナーゼ(J.Ferment.Techonl., 57:32-38, 1979)と、この実施例で得られた酵素の理化学的性質および酵素化学的性質である。

【0022】

【表3】

β -1,3-マンナーゼ

起源	<i>Penicillium lilacinum</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
至適 pH	4.0~5.0	5.0
至適温度 (°C)	50	50
pH 安定性	3.5~7.0	4 ~10 (30°C、30min)
温度安定性	40°C	pH5.0 で 30 分 40°C で安定 60°C で失活
分子量	38,000	52,000±1,000

【0023】

【発明の効果】以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、新規なエンド- β -1,3-マンナーゼと、このエンド- β -1,3-マンナーゼを効率よく製造する方法、並びにこの製造方法に用いることのできる新規なロドトルラ属酵母が提供される。この発明のエンド- β -1,3-マンナーゼは、 β -1,3-; β -1,4-マンナン of β -1,3-マンノシド結合を選択的に加水分解するため、反応時間を遅らせることにより、種々の分子量のマンノオリゴ糖を生成することができる。

*【図面の簡単な説明】

【図1】 β -1,3-; β -1,4-マンナンの構造およびエンド- β -1,3-マンナーゼの作用部位を示す。

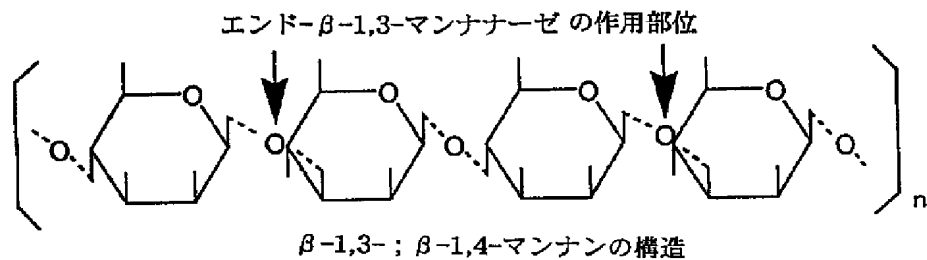
【図2】 β -1,4-マンノピオースの過ヨウ素酸酸化、還元および部分水解生成物を示す。

【図3】 β -1,3-; β -1,4-マンナンおよび β -1,4-マンノピオースの¹H NMRスペクトルを示す。

【図4】 β -1,3-; β -1,4-マンナンおよび β -1,4-マンノピオースの¹³C NMRスペクトルを示す。

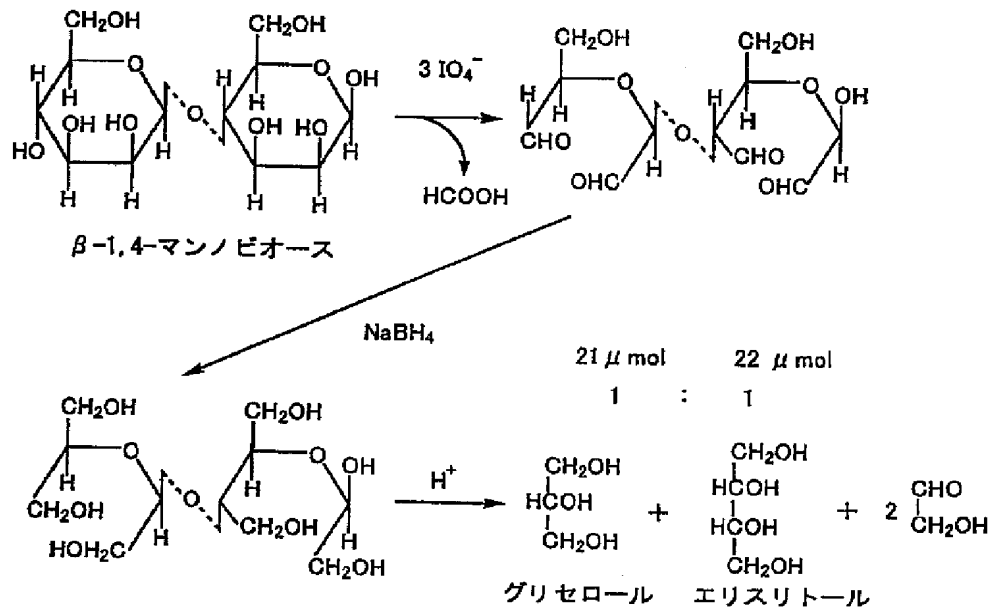
*

【図1】

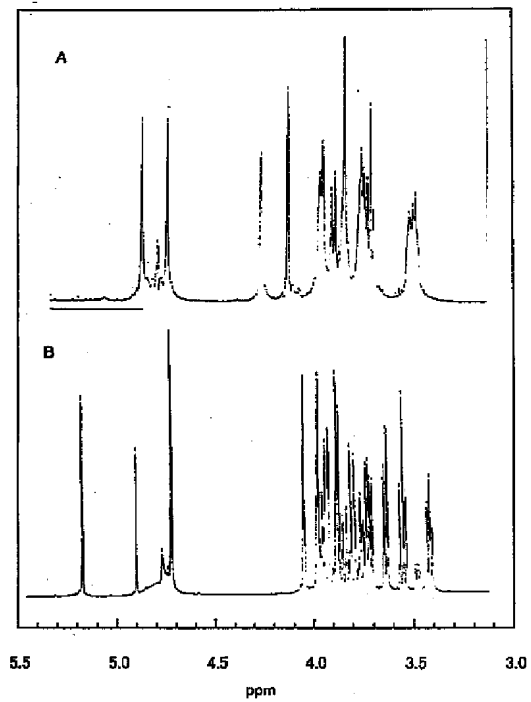


【図2】

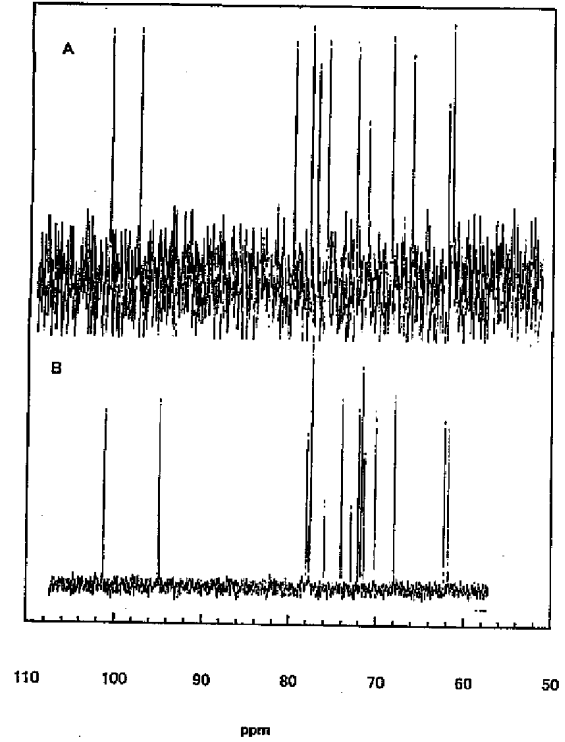
サンプル 28 μmol 過ヨウ素酸消費量 82 μmol
 1 2.9



【図3】

A: *Rhodotorula* マンナン, B: マンノビオース

【図4】

A: *Rhodotorula* マンナン, B: マンノビオース

フロントページの続き

(72)発明者 滝田 潤
山形県村山市笛田四丁目3-37 県村4号

Fターム(参考) 4B050 CC01 DD04 FF05E FF09E
LL05
4B065 AA78X AC14 AC15 BA22
CA31 CA41